ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *Pediococcus* sp. ในการผลิตโปรไบโอติกแบบผง

(Factors effecting the survival of Pediococcus sp. in the production of probiotic powder form)

จัดทำโดย

นางสาวเกศสุดา พอดี **รหัสนักศึกษา 44040751**

นายศาสตรา เฉลิมวงศ์วิจิตร **รหัสนักศึกษา 44040772**

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....Chans..... 5 / 11 / 47 **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(**)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20378

ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *Pediococcus* sp. ในการผลิตโปรไบโอติกแบบผง

(Factors effecting the survival of *Pediococcus* sp. in the production of probiotic powder form)

T096529

จัดทำโดย

นางสาวเกศสุดา พอดี รหัสประจำตัวนักศึกษา 44040751

นายศาสตรา เฉลิมวงศ์วิจิตร รหัสประจำตัวนักศึกษา 44040772

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2547

ปพ.
ก773ป
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางสาวเกศสุดา พอดี และ นายศาสตรา เฉลิมวงศ์วิจิตร 2547 : ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *Pediococcus* sp. ในการผลิตโปรไบโอติกแบบผง (Factors effecting the survival of *Pediococcus* sp. in the production of probiotic powder form) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์

ความต้องการใช้จุลินทรีย์ในฟาร์มเกษตรกรรมต่าง ๆ ซึ่งมีการเลี้ยงสัตว์จำนวนมากมักจะเกิดปัญหาภาวะโรคติดเชื้อในระบบต่าง ๆ อันมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง การใช้โปรไบโอติกเพื่อให้มีกลไกควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคภายในลักษณะการควบคุมโดยชีววิธีแบบเดียวกับการใช้ยาปฏิชีวนะ โปรไบโอติกหรือสารเสริมชีวนะ คือ อาหารเสริมซึ่งประกอบด้วย จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่และก่อให้เกิดประโยชน์ โดยช่วยปรับระดับความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต การใช้โปรไบโอติกจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อเป็นการส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร ให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น โดยไปเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายอาหารหรือช่วยสลายอาหารที่ย่อยยาก ทำให้ผลผลิตต่าง ๆ จากสัตว์ในฟาร์มสูงขึ้น จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกมีด้วยกันหลายชนิด ได้มีการทดลองนำเชื้อ *Pediococcus acidilactici* , *Pediococcus pentosaceus* และ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกมาผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนตที่เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ทำการทดลองเชื้อแต่ละตัวโดยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ผสม skimmed milk เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 32 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 ผสม skimmed milk เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 3 ผสม โซเดียมคลอไรด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนที่ 4 ผสมโซเดียมคลอไรด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำทั้ง 4 ส่วนบ่มไว้ประมาณ 30 วัน พบว่า เชื้อที่ผสม skimmed milk และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด โดยเชื้อ *Pediococcus* มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า *Lactobacillus* และการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องคือประมาณ 32 องศาเซลเซียส การผสม skimmed milk ลงไปในอาหารสัตว์จะพบปริมาณการอยู่รอดของเซลล์มากกว่าโซเดียมคลอไรด์ เพราะ skimmed milk จะช่วยป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ ดังนั้นในการเลือกใช้เชื้อ *Pediococcus* ผสม skimmed milk ในอาหารสัตว์จึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกและสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้ที่สัตว์บริโภคอาหารมีสุขภาพแข็งแรง และช่วยให้มีผลผลิตสูงขึ้นด้วย

เกศสุดา พอดี — ศาสตรา เฉลิมวงศ์วิจิตร — 5/11/47

ลายมือชื่อ น.ศ. ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานเล่มนี้ประสบความสำเร็จได้โดยการให้ความช่วยเหลือของหลายฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจารย์ที่ปรึกษาคือ ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์ที่สละเวลาอันมีค่ามาให้คำแนะนำและช่วยเหลือดูแลและให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อข้าพเจ้า ขอขอบคุณเพื่อน ๆ สาขาเทคโนโลยีการหมักทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบคุณอาจารย์วริพัสย์ อารีกุล ที่สละเวลามาเป็นกรรมการสอบครั้งนี้

ขอขอบคุณนายนครินทร์ แตงทิพย์ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านเทคโนโลยีและการทำ Power point และ สุดท้ายขอขอบคุณพ่อและแม่ที่เป็นหน่วยสนับสนุนทางด้านการเงิน และกำลังใจดี ๆ ที่ทำให้ลูกทั้ง 2 คนนี้มีพลังในการทำงาน

นางสาวเกศสุดา พอดี

นายศาสตรา เฉลิมวงศ์วิจิตร

ตุลาคม 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
2 การตรวจเอกสาร	2
ข้อมูลเบื้องต้นของโปรไบโอติก	3
จุดประสงค์ในการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์	4
หลักการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี	5
ลักษณะการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี	7
จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก	7
ความต้องการโปรไบโอติก	11
กลไกการทำงานของโปรไบโอติก	11
กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย	16
รูปแบบของการใช้สารเสริมชีวนะในอาหารสัตว์	17
หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ	18
วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก	18
ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์	20
คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา	20
การจำแนกบักเตรีในสกุล *Pediococcus*	24
อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของบักเตรีในสกุล *Pediococcus*	26
สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของบักเตรี *Pediococcus*	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง		หน้า
บทที่		
3	อุปกรณ์และวิธีการ	30
	สารเคมี	30
	อุปกรณ์ในการวิเคราะห์	30
	เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	30
	สถานที่ในการทดลอง	31
	วิธีการทดลอง	31
4	ผลการทดลองและวิจารณ์	35
5	สรุปผลการทดลอง	41
	ข้อเสนอแนะ	42
	เอกสารอ้างอิง	43
	ภาคผนวก ก	
	ภาคผนวก ข	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	เปรียบเทียบคุณสมบัติและการทำงานของโปรไบโอติกกับสารปฏิชีวนะ	6
2	ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโปรไบโอติก	8
3	สารเสริมชีวนะที่จำหน่ายทางการค้า	10
4	ผลผลิตที่ได้จากการใช้น้ำตาลและกรดอินทรีย์ในการหมักของแบคทีเรียกลุ่ม ต่าง ๆ แสดงในรูปของโมลาร์	21
5	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร) ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536	35
6	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร)ของเชื้อ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4)	36
7	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร)ของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1)	36
8	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตในสภาวะกระเพาะและลำไส้ ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536	38
9	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตในสภาวะกระเพาะและลำไส้ ของเชื้อ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4)	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก	19
2	กระบวนการเมแทบอลิซึมโดยอาศัยกลูโคสและฟรุกโตสของ homofermemtative lactic acid bacteria โดย glycolysis pathway	22
3	กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสและฟรุกโตสของ heterofermemtative lactic acid bacteria โดย phosphoketolase pathway	23
4	แสดงขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสม	32
5	แสดงขั้นตอนการจำลองสภาวะกระเพาะและลำไส้	34
6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาที) กับ log CFU/ml ในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร	40
7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาที) กับ log CFU/ml ในสภาวะจำลองลำไส้สัตว์	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ปัจจุบันมีจำนวนประชากรเพิ่มมากขึ้นทุกปี ดังนั้นแหล่งอาหารที่นำมาใช้ในการบริโภค เช่น เนื้อสัตว์ จึงต้องมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย อาหารโปรตีนจากเนื้อสัตว์นับว่ามีความสำคัญต่อประชากรโลก การเลี้ยงสัตว์ในปัจจุบันมีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพื่อให้เพียงพอต่อการบริโภคของประชากร และตอบสนองต่อความต้องการของตลาดที่มีเพิ่มขึ้นทุกปี จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตทั้งด้านการปรับปรุงสายพันธุ์สัตว์ การจัดการเลี้ยงดูและคุณภาพอาหารสัตว์ สารปฏิชีวนะได้ถูกนำมาใช้ในระดับต่ำ (20-50 ส่วนในล้านส่วน) เพื่อเร่งการเจริญ ทำให้สัตว์มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น ปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้สารอาหาร และปัจจัยอื่น ๆ เกี่ยวกับการผลิตสัตว์ และเพื่อป้องกันการติดเชื้อในช่วงที่สัตว์อยู่ในสภาวะไวต่อการติดเชื้อ แต่สัตว์ที่ได้รับสารปฏิชีวนะในระดับต่ำเป็นเวลานาน ทำให้มีการพัฒนาของเชื้อดื้อยาขึ้นในลำไส้ ยาปฏิชีวนะอาจสะสมอยู่ในเนื้อสัตว์ เมื่อมนุษย์บริโภคเข้าไปอาจส่งผลให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยในทางเดินเกิดการดื้อยาไปด้วย การดื้อต่อยาของเชื้อก่อโรค นำไปสู่ปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาโรคในมนุษย์ไม่ได้ผล รวมถึงสัตว์อื่น ๆ ด้วย การส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ต้องได้รับผลกระทบอย่างมาก เมื่อตรวจพบสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์ เนื่องจากในต่างประเทศใช้มาตรฐานสุขอนามัยเป็นข้อบังคับในการกำหนดคุณภาพสินค้า การนำจุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติก มาใช้เสริมในอาหารสัตว์ เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงและเพิ่มภูมิต้านทานแก่สัตว์ จึงเป็นแนวทางที่ผู้ศึกษาสนใจกันมาก จุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโปรไบโอติกจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อสัตว์และต้องแสดงให้เห็นผลดีกว่าการไม่เติมโปรไบโอติกได้ชัดเจน ในปัจจุบันมีโรงงานผลิตอาหารสัตว์มากมาย และได้มีการคิดค้นสูตรอาหารใหม่ ๆ มีการเติมจุลินทรีย์โปรไบโอติก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่อาหารสัตว์ ประเทศไทยได้มีการประกาศการใช้โปรไบโอติกไว้ในประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 โดยใช้ชื่อเรียกว่า สารเสริมชีวนะ การที่ประเทศไทยประกาศการใช้สารเสริมชีวนะหรือโปรไบโอติกในอาหารสัตว์ ทำให้ต่างประเทศมั่นใจในคุณภาพเนื้อสัตว์ส่งออก โดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ใช้เป็นพวกแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารเสริมชีวนะ หรือโปรไบโอติกสำหรับสัตว์ในฟาร์มสามารถแยกได้จากอาหารหมักดองของไทย การศึกษานี้เป็นการศึกษาสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติก หาสูตรอาหาร สภาวะที่เหมาะสม และศึกษาวิธีการเก็บรักษาที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานที่สุด เพื่อลดต้นทุนการผลิต , ลดการนำเข้าของเชื้อที่ต้องสั่งจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงและไม่เหมาะกับสภาแวดล้อมของไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก
2. เพื่อเปรียบเทียบเชื้อสายพันธุ์ที่ได้จากแหนมและจากบริษัทที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดในอาหารสัตว์
3. เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตในรูปผงในกระเพาะและลำไส้จำลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลเบื้องต้นของโปรไบโอติก

โปรไบโอติก (Probiotic) หรือสารเสริมชีวนะ จัดเป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ตามประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและมีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ ทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสภาวะสมดุล ช่วยให้ระบบย่อยอาหารดีขึ้น การเจริญเติบโตของสัตว์ดีขึ้น ไม่มีปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การดื้อยา หรือสารตกค้าง ใช้ได้กับสัตว์หลายประเภท

คำว่าโปรไบโอติก (Probiotic) มาจากภาษากรีก แปลว่า "เพื่อชีวิต" Lilly และ Stillwell (1965)เป็นบุคคลแรกที่นำมาอธิบายสารที่หลั่งออกมาจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งและมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงมีความหมายตรงกันข้ามกับคำว่า "Antibiotic" หรือสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความหมายเพิ่มเติม คือ

Parker (1974) เป็นคนแรกที่ใช้คำว่า Probiotic เพื่ออธิบายถึงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการป้อนสัตว์ โดยให้คำจำกัดความว่า "จุลินทรีย์ หรือ สารที่ทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสมดุล"

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (1989) ประเทศสหรัฐอเมริกา หรือ FDA (The United States Food and Drug Administration) ได้เปลี่ยนมาใช้คำว่า DFM (Direct – Fed Microbial)แทนคำว่า Probiotic และได้ให้ความหมายว่าเป็นแหล่งของจุลินทรีย์มีชีวิต ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ นอกจาก FDA และAAFCO (The Association of American Feed Control Official) ได้จัดให้จุลินทรีย์ DFM เป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) ingredients เป็น Food and Food additive ที่ปลอดภัยสามารถเป็นอาหารของมนุษย์ได้โดยผ่านการพิจารณาจากนักเภสัชกรและนักพิษวิทยาแล้ว

Fuller (1989) ทบทวนคำจำกัดความ และกล่าวว่า Probiotic คือ "อาหารเสริม ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ โดยปรับปรุงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ให้สมดุล"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Teark และ Wilkinson (1989) จากสหราชอาณาจักรอังกฤษให้คำจำกัดความว่า "เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตไม่ก่อให้เกิดโรค สามารถให้สัตว์กินเพื่อปรุบปรุงอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและทำให้สัตว์มีสุขภาพดีขึ้น"

โปรไบโอติกในความหมายของ ศิริรัตน์(1988) ผู้นำเสนอผลงาน "Probiotic BS-11" ซึ่งเป็น โปรไบโอติกที่ใช้ในบ่อกุ้ง ได้กล่าวให้ความหมายไว้ว่า "โปร" คือ การเตรียม "ไบโอติก" คือ ชีวิต ดังนั้นความหมายของโปรไบโอติกคือ การเตรียมพร้อมให้สิ่งมีชีวิตมีสุขภาพแข็งแรง ซึ่งก็คือ จุลินทรีย์จากคำจำกัดความ นั่นคือจุลินทรีย์ที่เมื่อผู้บริโภคเข้าไปแล้ว สามารถเข้าไปแกะผิวหน้าของทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ตาย แล้วผลิตสารบางอย่างเพื่อเป็นการแก่งแย่งกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

นอกจากนี้ยังมีการให้ความหมายของโปรไบโอติก ว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดจำเพาะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (โดยเฉพาะ *Lactobacillus* sp.) แล้วเสริมในอาหารสัตว์ มีผลทำให้การเพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และลดจำนวนของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษ

2. <u>จุดประสงค์ในการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์</u>

ความต้องการใช้จุลินทรีย์ในฟาร์มเกษตรกรรมต่าง ๆ ซึ่งมีการเลี้ยงสัตว์จำนวนมากมักจะเกิดปัญหาภาวะโรคติดเชื้อในระบบต่าง ๆ อันมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง การใช้โปรไบโอติกเพื่อให้มีกลไกควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคภายในลักษณะการควบคุมโดยชีววิธี (Biological control) แบบเดียวกับการใช้ยาปฏิชีวนะ ดังนั้นการใช้โปรไบโอติกจึงมีความมุ่งหมายเพื่อ

1. เพื่อเป็นการส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตขึ้น
2. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร ให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น โดยไปเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายอาหารหรือช่วยสลายอาหารที่ย่อยยาก
3. ทำให้ผลผลิตต่าง ๆ จากสัตว์ในฟาร์มสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. หลักการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

3.1 ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคโดย

- สร้างสาร Antibacterial substance
- ขัดขวางเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
- สามารถจับกับผนังของลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคไม่สามารถเกาะ และก่อตัวในทางเดินอาหารได้

3.2 ช่วยระบบย่อยอาหารโดย

- สร้าง Lactic acid ทำให้กระเพาะมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น การย่อยอาหารดีขึ้น
- สร้างน้ำย่อย เช่น Pectinase , Cellulase
- ลดพิษของ amine และ แอมโมเนีย

3.3 กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคโดย

- มีการสร้างสาร Antibody มากขึ้น
- เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ Macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ใน การกินจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค หรือสารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์

1. ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนการใช้สารปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ที่อาจเกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรค และสารตกค้าง

2. ช่วยให้ระบบย่อยอาหารในสัตว์ดีขึ้น

3. ป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ เนื่องจากโปรไบโอติกทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น

ซึ่งโปรไบโอติกจะมีคุณสมบัติที่ดีแตกต่างจากสารปฏิชีวนะดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติและการทำงานของโปรไบโอติกกับสารปฏิชีวนะ

โปรไบโอติก	สารปฏิชีวนะ
คุณสมบัติ 1. เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต 2. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร 3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. ไม่ทำให้เกิดสารตกค้างในสัตว์ 5. ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์	คุณสมบัติ 1. เป็นสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ 2. ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร 3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. อาจทำให้เกิดสารตกค้างในสัตว์ 5. อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์
การออกฤทธิ์ 1. สร้างกรดและลด pH ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค 2. ทำงานเจาะจงเฉพาะที่ 3. แบ่งตัวเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารและแย่งจับพื้นที่บริเวณทางเดินอาหารกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค	การออกฤทธิ์ 1. ยับยั้งการสร้างโปรตีน DNA , RNA ของเซลล์สิ่งมีชีวิต 2. พื้นที่การทำงานกว้าง 3. ไม่มีการเพิ่มจำนวน

ที่มา : อภิศุกร (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ลักษณะการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

1. เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตมากขึ้น และมีความต้านทานต่อโรคดีขึ้น
2. ไม่ทำให้เกิดโรคและไม่มีพิษ (non- pathogenic , non- toxic)
3. เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและจำนวนมากพอที่จะเดินทางไปถึงทางเดินอาหารส่วนท้ายได้
4. ทนต่อสภาพกรดในกระเพาะและน้ำดีในลำไส้ได้ และสามารถย่อยสลายในลำไส้ได้ดี
5. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานได้ในสภาพที่เก็บรักษาและการใช้งานจริงในฟาร์ม
6. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานหลังจากทำการการผสมกับอาหารสัตว์ เนื่องจากการผลิตอาหารสัตว์บางชนิดต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อน , แรงอัดเพื่อการอัดเม็ด และสภาพที่เป็นกรด หรือการ extrusion และ oxidation
7. ไม่ตกค้างในซากสัตว์
8. ราคาไม่แพง
9. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร
10. ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
11. ไม่ทำให้เกิดการแพ้
12. เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตจำนวนมากในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้

5. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็ก ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกซึ่งมีผลทางอ้อมต่อผลผลิตสัตว์ในด้านต่าง ๆ() ดังนี้

1. จุลินทรีย์บางชนิดสร้างจุลินทรีย์และสารที่ไม่ทราบชนิด ซึ่งไม่เพียงแต่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารสัตว์ แต่ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตด้วยและยังให้กรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น ไลซีน เมไทโอนิน เพื่อเป็นต้นกำเนิดในการสร้างโปรตีนและไขมัน

2. จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเอมไซม์เฉพะเจาะจงที่จะย่อยส่วนประกอบเชิงซ้อนให้เป็นน้ำตาลเชิงเดียว กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน ซึ่งสัตว์และจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่สามารถนำไปใช้ต่อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์สร้างเอมไซม์หลายชนิด เช่น เซลลูเลส ไซลาเนส ไลเพส โพนทีเอส บีต้า-กลูคาเนส แอนิเลส ซึ่งช่วยในการย่อยอาหารได้

3. จุลินทรีย์สามารถสร้างสารปรุงแต่งพิเศษและสารหอมระเหยซึ่งสามารถส่งเสริมการกินอาหารทำให้สัตว์กินอาหารได้มากขึ้น

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติกโดยสร้างโคโลนีทุกพื้นที่ของทางเดินอาหารและเคลื่อนที่จากปากไปสู่ปลายทางคือทวารจะไม่เคลื่อนที่ย้อนทาง บทบาทสำคัญของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่เหล่านี้ ช่วยย่อยอาหารและลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างจุลินทรีย์ด้วยกันและระหว่างจุลินทรีย์กับ host จุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้าง acetate lactata propionate volatile acid วิตามิน เอมไซม์ สารต้านแบคทีเรียและสารประกอบเคมีที่ไม่ทราบชนิด

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกนี้อาจเป็นแบคทีเรีย รา หรือ ยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งคุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์จะแตกต่างกัน

ตารางที่ 2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโปรไบโอติก

ชนิดจุลินทรีย์	หน้าที่เพื่อผลิต
Bacillus subtilis	Amylase, Protease
Bifidobacterium bifidum	Lactic and Formic acid, Glycosidase, Urease
Lactobacillus acidophilus	Acidophilin, Glycosidase, Lactic acid
Lactobacillus casei	Oxidation/Reduction potential
Lactobacillus lactis	Amylase, Protease, Hydrogen peroxide
Streptococcus diacetyllactis	Acetic acid, Diacetyl, Bile transformation
Yeast *(Saccharomycer cerevisiae)*	Amylase, Protease, Lipase, Cellulase, B-complex
Fungal*(Aspergillus oryzae* or *A.niger*)	Amylase, Protease, Lipase, Cellulase, B-complex

ที่มา : Kung (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเสริมชีวนะหรือโปรไบโอติกก่อให้เกิดประโยชน์กับสัตว์หลายด้าน แต่การใช้โปรไบโอติกจะต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 โดยมีระดับการใช้ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปไม่น้อยกว่า 1 x 10^5 CFU (colony forming unit) ต่ออาหารสัตว์ 1 กรัม จุลินทรีย์ที่กำหนดให้ใช้เป็นโปรไบโอติกตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 มีดังนี้

1. แบคทีเรีย

Bacillus coagulan , *B. lentus* , *B. licheniformis* , *B. pumilus* , *B. subtilis* (สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารปฏิชีวนะ) , *B. subtilis* BN , *B. toyo* , *Bacteroides amylophilus* , *Bacteroides ruminicola* , *Bacteroides suis* , *Bifidobacterium adolescentis* , *Bifidobacterium animalis* , *Bifidobacterium bifidum* , *Bifidobacterium infantis* , *Bifidobacterium longum* , *Bifidobacterium chamophilus* , *Lactobacillus bulgaricus* , *L. cellobiosus* ,*L.curatus* , *L. delbruekii* ,*L. fermentum*, *L. helveticus* , *L.lactis* , *L.plantarum* , *L.reuterii* , *Leuconostoc mesenteroides* , *Pediococcus acidilactici* , *P. cerevisiae* ,*P. pentosaceus*, *Propionibacterium shemanii* , *Lactococcus cremoris* , *L. diacetylactis* , *Enterococcus faecium* , *Streptococcus faecium cernelle* 68 , *S. intermedius* และ *S. thermophilus*

2. เชื้อรา

Aspergillus niger และ *A. oryzae*

3. ยีสต์

Candida pintolepessi , *Saccharomyces cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 สารเสริมชีวนะที่จำหน่ายทางการค้า

ชื่อทางการค้า	ชนิดของสารเสริมชีวนะ	สายพันธุ์อ้างอิง
Bactocell ®	*Pediococcus acidilactici*	CNCM MA18/5M
Biacton ®	*Lactobacillus farciminis*	CNCM MA 67/4R
Bioplus 2B ®	[In a 1/1 ratio] *Bacillus licheniformis* *Baciilu subtilis*	 Strain CH200 DSM 5749 Strain CH201 DSM 5750
Biosprint ®	*Saccharomyces cerevisiae*	BCCM/MUCL 39885
Bonvital ®	*Enterococcus faecium* *Lactobacillus rhamnosus*	DSM 7134 DSM 7133
Biosaf Sc 47 (Sacc. Cer.) ®	*Saccharomyces cerevisiae*	Sc 47 NCYC Sc47
Cylactin LBC ®	*Enterococcus faecium*	NCIB 1045
Levucell SB20 ®	*Saccharomyces cerevisiae*	CNCM 1-1079
Levucell Sc20 ®	*Saccharomyces cerevisiae*	CNCM 1-1077
Paciflor C 10®	*Bacillus cereus*	CIP 5832/ATCC 14893
Probios PDFM	*Enterococcus faecium*	20.2 DSM 4788 / ATCC 53519
Granular®	*Enterococcus faecium*	30.1 DSM 4789 / ATCC 65593
Toyocerin®	*Bacillus cereus var. toyoi*	CNCMI 10121 / NCCIB 401121
YEA-SACC ®	*Saccharomyces cerevisiae*	CBS 49394
Microferm ®	*Enterococcus faecium*	M74 CDSM 5464 for piglet
Oralin ®	*Enterococcus faecium*	NCIB 10415 for Pig

ที่มา : Anonymous (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ความต้องการโปรไบโอติก

สภาพปัจจุบันสิ่งมีชีวิตมีสภาวะแวดล้อมที่ไม่เป็นธรรมชาติ ซึ่งต้องมีการปฏิบัติตนอย่างระมัดระวังหรือการดูแลอนามัยที่ดี มีข้อจำกัดมากมายเกี่ยวกับการบริโภคหรือการกินอาหารที่ไม่เป็นธรรมชาติ มีภาวะกดดัน มีโอกาสสัมผัสหรือมีการเลี้ยงดูของแม่และลูกน้อยลง ภาวะที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อทำลายจุลินทรีย์ ภาวะกดดันรวมทั้งความเครียด ล้วนมีผลต่อจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ทั้งสิ้น โดยมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมคือ อาจทำให้จุลินทรีย์มีองค์ประกอบที่ผิดแปลกไปจากเดิม มีบางอย่างบกพร่อง อันมีผลต่อการแสดงออกถึงความต้านทานโรคลดลง มีความไวต่อการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค มีผลต่อการเจริญเติบโตในวัยอ่อนลดลง

การใช้โปรไบโอติกจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้มีการเสริมสร้างหรือซ่อมแซมฟื้นฟูในส่วนที่บกพร่องต่าง ๆ เหล่านี้ให้กลับคืนสู่สภาพเดิมปกติ เพื่อทำหน้าที่ปกป้องและควบคุมจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่บุกรุกได้ดีอย่างมีประสิทธิภาพเท่าเดิม ซึ่งมีความแตกต่างจากการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งมุ่งไปที่การให้การรักษาและมีการส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยไม่ได้คำนึงถึงผลข้างเคียงที่ตามมา

7. กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

7.1 การผลิตสารต่อต้านจุลชีพ

7.1.1กรดอินทรีย์ (organic acid)

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกได้แก่ กรดแลกติกและกรดอะซิติก สำหรับกรดอะซิติกเป็นตัวยับยั้งที่แรงที่สุดและมีช่วงของการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ ราและแบคทีเรีย การใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดอัตราการเจริญของ *Salmonella typhimurium* ได้มากกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว จึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมี synergistic activity

เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปใน cytoplasm ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรดจึงทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ โดยการเกิดปฏิกิริยากับเซลล์ มีผลทำลายเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวจุลินทรีย์นั้นๆ แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีรายงานว่า สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคส่วนใหญ่จะเป็น *Lactobacillus* ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus sake*ที่แยกจากเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อสามารถสร้างกรดอินทรีย์มายับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium*และ *Staphylococcus aureus* ได้ นอกจากนี้ *Enterococcus* ก็สามารถกรดแลกติกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.1.2ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

มีรายงานว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.12 มิลลิโมล / ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *lactococci* ได้ร้อยละ 50 และความเข้มข้นมากกว่า 1.5 มิลลิโมล / ลิตร จะทำให้เซลล์ตาย

ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลกติกจะสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรงต่อแบคทีเรีย โดยหมู่ sulfhydryl ภายในโมเลกุลโปรตีนของเซลล์และในชั้นไขมันเมมเบรนสามารถถูกออกซิไดซ์ได้ ทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลิอิกและโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ เช่น ในน้ำนมดิบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะรวมตัวกับไธโอไซยาเนต โดยเอมไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส เกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้ โครงสร้างเมมเบรนของแบคทีเรียจะถูกทำลายหรือเปลี่ยนแปลงได้เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโปไธโอไซยาไนต์

7.1.3 คาร์บอนไดออกไซด์

ส่วนมากคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดจากระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลคติกแบบ heterofermentative fermentation นอกจากนี้วิธีเมตาบอลิซึมอื่นๆก็สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในระหว่างกระบวนการหมัก คาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอมไซม์ของกระบวนการ Decarboxylation และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมันก็เป็นเหตุให้คุณสมบัติในการซึมผ่านของสารเสียไป ที่ความเข้มข้นสูงสามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้

7.1.4 ไดอะซิติล

มีรายงานว่าไดอะซิติลมีฤทธิ์ต่อต้าน *Bacillus* sp. แบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างไดอะซิติลได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* นอกจากนี้ยังพบว่าไดอะซิติลยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และราได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกกลไกยับยั้งของไดอะซิติลคาดว่าเกิดจากการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ยึดกับตรงตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จีนีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนหรือเอมไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.1.5สารต่อต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

สารต่อต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่มีคุณสมบัติว่องไวที่ pH ต่ำ เสถียรต่อความร้อน มีฤทธิ์ในการทำงานได้กว้างและละลายได้ในอะซิโตน จำแนกสารได้ 2 ชนิดคือ Reuterin ซึ่งสร้างโดย *Lactobacillus Reuterin* ซึ่งประจำอยู่ในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ Reuterin สามารถยับยั้งแบคทีเรีย รา โปรโตซัว และไวรัสได้ โดยจะไปทำปฏิกิริยาต่อต้านกับหมู่ sulfhydryl ของเอนไซม์โบนิวคลีโอไทด์ รีดักเทส ซึ่งสำคัญสำหรับกระบวนการสังเคราะห์ DNA ส่วนสารอีกชนิดคือ 2-pyrorolidone-5-carboxylic acid (pca) ซึ่งสร้างโดย *Lactobacillus casei.,Pseudoplantarum* spp. และ *Streptococcus bovis* ซึ่งสามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis, Enterobacter colacae* และ *Pseudomonas putida* ได้

7.1.6 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น คุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน จะพิจารณาจากขนาด ความคงตัว ตำแหน่งทางพันธุกรรม การดัดแปลงหลังผ่านกระบวนการการแปลรหัสทางพันธุกรรม และกลไกการทำงานของสารแบคเทอริโอซินแบ่งได้เป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

1.Class I : Lantibiotic

1.1Nisin

Nisin A ควบคุมการสร้างยีนโดย Nis A ขนาด 174 bp โมเลกุลของ pre- nisin เป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 57 ตัว เกิดขึ้นมาหลังผ่านกระบวนการแปลรหัสทางพันธุกรรม และเปลี่ยนมาอยู่ในรูป pro- nisin เมื่อตัดกรดอะมิโนตรง leader peptide ของ pre- nisin ออกไป 3 ตัว โมเลกุลสมบูรณ์ที่พร้อมจะทำงานได้ต้องผ่านกระบวนการ dehydration ก่อน จะได้ลักษณะโมเลกุลมีประจุบวกและไม่ชอบน้ำ โมเลกุลที่ได้มีขนาดเล็ก และมักพบอยู่ 2 โมเลกุล ที่มีความเสถียร nisin-A มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ที่ไวต่อสารชนิดนี้ให้ตายได้ใน 1 นาที โดย nisin จะเป็นทำปฏิกิริยาโดยตรงระหว่างโมเลกุลของ nisin และเยื่อหุ้มเซลล์ บางครั้งเกิดจากประจุบวกของ nisin ทำปฏิกิริยากับประจุลบที่ผนังเซลล์ เมื่อ nisin จะแทรกเข้าไปภายใน จะทำให้เกิดรูที่ผนังเซลล์ เป็นผลให้สารประกอบน้ำหนักโมเลกุลต่ำภายในเซลล์ไหลออกมาอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ nisin ยังไปลดประจุที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วย nisin สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารในห่วงโซ่อิเล็กตรอนได้ เป็นผลให้การรับออกซิเจนถูกยับยั้ง เซลล์ที่ไวต่อ nisin จึงไม่สามารถรับพลังงานไปใช้ในการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน หรือกรดนิวคลีอิก นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม chealating agent จะช่วยให้เซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อ nisin โดยสารนี้จะไปรบกวนสภาพความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ ยอมให้แบคเทอริโอซินเข้าไปในเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nisin Z มีคุณสมบัติแพร่ผ่านวุ้นได้ดี และแสดงกิจกรรมทางชีววิทยาเช่นเดียวกับ nisin A แตกต่างกันที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 ของสายเปปไทด์ โดย Nisin Z จะมี histidine แทนที่ตำแหน่ง aspartate ของ nisin A และจากการศึกษาพบว่า *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* สายพันธุ์ NSC1 สามารถผลิตไนซินชนิดที่มีลำดับกรดอะมิโนที่27 เป็นแอสพาราจีน จึงพิสูจน์ว่าเป็นไนซินชนิดz สำหรับโครงสร้างปฐมภูมิของ nisin A และ nisin Z

1.2 Lactocin S

เป็น lantibiotic ที่ผลิตโดย *Lactobacillus sake* โมเลกุลที่สามารถทำงานได้จะเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยอะมิโน 37 ตัว และอยู่กับ lanthionine 2 กลุ่ม

1.3 Lactocin 481

ผลิตโดย *Lactobacillus lactis* โครงสร้างปฐมภูมิของ Lactocin 481 ไม่มีความสัมพันธ์กับ nisin เมื่อพัฒนาเป็นโมเลกุลที่สมบูรณ์พร้อมทำงาน จะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโน 27 ตัว และแสดงลักษณะของ lanthionine ด้วย

2. Class II : Small heat-stable bacteriocin

ขนาดโมเลกุลจะเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 และ 57 ตัวตามลำดับจะออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม แบคเทอริโอซินในคลาสนี้ได้แก่

2.1 Lactococcin A

มีตำแหน่งของยีนที่สร้างบน conjugative plasmid p9B4 โมเลกุลที่พัฒนาจนสามารถทำงานได้ เป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วนกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว 5 ตัว สำหรับกลไกการทำงานของมันจะเหมือนกับ nisin, Lactococcin A จะออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเซลล์มีความไวต่อสารโดยจะไปรบกวนความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้นเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำขนาดเล็ก Lactococcin A จะเกิดอันตรกิริยากับ receptor ที่จำเพาะบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดรู แต่การเกิดรูโดย Lactococcin A จะไม่ขึ้นอยู่กับความต่างศักย์ไฟฟ้าบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Lactococcin B

เป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 47 ตัวกลไลการทำงานของ Lactococcin B จะคล้ายกับ Lactococcin A ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Lactococcin B อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกับ Lactococcin A

2.3 Lactococcin M

ยีนที่เกี่ยวกับการสร้างสารจะอยู่บน conjugative plasmid p9B4 เช่นเดียวกับ Lactococcin A และ B

2.4 Small heat-stable กลุ่มอื่นๆ

ได้แก่ pediocinPA-1 และ pediocin AcH,leucocinA-UAL,mesentercin Y105,sakacin A, sakacin Pและ curvacinA แบคเทอริโอซินเหล่านี้จะเป็นเปปไทด์สายตรงที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36-44 ตัว มีรายงานว่า pediocin PA-1 ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของแบคทีเรียที่ไวต่อสารยับยั้งจุลชีพชนิดนี้

2.5 Lactacin F

Lactacin F เป็นแบคเทอริโอซิน ที่สร้างโดย *Lactobacillus acidophilus* 11088 (NCK88) มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่เสถียรและทนทานต่อความร้อนสามารถทนต่อการนึ่งฆ่าเชื้อโรคอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีขนาดโมเลกุล 180 kDa.มีโครงสร้างเป็นโปรตีนก้อนกลมมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้ง *Lactobacillus acidophilu , L . fermentum ,Enterococcus faecalis , L.delbrueckii subsp.lactis* และ *L. delbrueckii subsp.bulgaricus* อย่างไรก็ตาม Lactacin F สามารถถูกทำลายโดย proteinaseK,subtilisin,trypsin และ ficin แต่ไม่ได้รับผลกระทบจาก lysozyme , lipase

2.6 Lactococcin G

เป็นแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมการทำงานโดยอาศัยเปปไทด์ ที่มีความยาวของกรดอะมิโนประมาณ 39 และ 35 ตัว เปปไทด์ทั้งสองมีประจุสูง จึงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Class III :Large heat-labile bacteriocin

ที่มีการค้นพบคือ helveticin J ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* 481 เป็นโปรตีนขนาด 37 kDa มีฤทธิ์ในการยับยั้งและควบคุมการสร้างโปรตีนโดยยีน hlyJ กลไกการทำงานจะต่างจาก Class I และI I ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินใน Class นี้ได้แก่ casecin 80,lacticin Aและ B และ aciddophilin A

จากการศึกษาพบว่า *Lactobacilli* และ *Streptococci* สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพที่โมเลกุลใหญ่พวก acidolin และ nisinได้

7.2 การยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ครอบครองพื้นที่ของเซลล์เยื่อบุระบบทางเดินอาหารเป็นกลไกการป้องกันโดยขัดขวางการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E.coli* และ *Salmonella* กลไกการยึดเกาะจะเริ่มตั้งแต่แบคทีเรียกกรดแลคติคเจริญติดกับผนังลำไส้แล้วสามารถเพิ่มจำนวนแล้วเพาะตัวในส่วน lumen ของสัตว์ ซึ่งทราบได้จากการศึกษาตัวอย่างกระเพาะอาหารหมู และในกระเพาะพักและกระพุ้งก้นของไก่ ต่อมาแบคทีเรียกรดแลคติคจะยึดครองบริเวณ receptor ที่ผิวเซลล์ ทำให้แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคถูกกำจัดออกไปจากทางเดินอาหาร

แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค *E.coli* ยึดเกาะที่เซลล์เป้าหมายด้วย Proteinaceous projection (pili) ส่วน *Lactobacilli* จะยึดเกาะที่ผนังลำไส้ด้วย extracellular substance ซึ่งประกอบด้วย polysaccharide,protein,lipid และ lipoteichoic acid สำหรับ lipoteichoic acid จะเป็นโพลิเมอร์ของ glycerolphosphate ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ *Lactobacilli*

7.3กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน

8. <u>กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย</u>

กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย (Mode of action of live bacterial culture) ที่เป็นสารเสริมชีวนะ สามารถจะอธิบายได้ว่า เมื่อสัตว์กินจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นสารเสริมชีวนะเข้าไป แบคทีเรียนั้นจะแพร่พันธุ์และก่อตัวที่ผิวทางเดินอาหาร เป็นผลให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งสัตว์กินเข้าไปภายหลังเจริญเติบโตและเกาะที่ผนังลำไส้ยากมากขึ้น เช่น แลคติกแอซิดแบคทีเรีย จะสร้างกรดอินทรีย์ (organic acid) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นผลให้ pH ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบทางเดินอาหารเปลี่ยน ซึ่งผลดังกล่าวไม่เหมาะสมกับการคงตัวหรือการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคหรือแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างเอมไซม์ เช่น เชื้อ *Lactobacilli* สามารถสร้างเอมไซม์แลกเทส (lactase) และอะไมเลส (amylase) ทำให้ร่างกายได้รับเอมไซม์มากขึ้น เป็นผลทำให้การย่อยอาหารดีขึ้น โดยมีการทำงานเป็นแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) ของเอมไซม์ในทางเดินอาหารและกระบวนการย่อยอาหาร แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างวิตามินบี 12 ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตของสัตว์ดีขึ้น เนื่องจากวิตามินดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน การสร้างโปรตีน การเปลี่ยนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารโดยการให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อลูกสัตว์แรกเกิดจำนวนมากก่อสร้างสารจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นประโยชน์ อาจช่วยสัตว์สร้างจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และช่วยควบคุมหรือขจัดจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค การแข่งขันเพื่อยับยั้งการออกฤทธิ์โดย Fox (1988) และ Stark และ Wilkinson (1989) ได้วิจัยการแข่งขัน การเกาะ การจับหรือการก่อตัวในทางเดินอาหารของ *Lactobacilli* และแบคทีเรียก่อโรคเพื่อครอบครองทางเดินอาหาร การป้องกันพิษของแอมีน(amine) และก๊าซแอมโมเนีย (ammonia) เนื่องจากโปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นเอมายและก๊าซแอมโมเนียโดยการเพิ่ม metabolic activity ของเชื้อ *E.coli* เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ไม่เฉพาะเจาะจง (Non-spfcific immunomodulators) ในมดลูกสุกรที่กิน *Lactobacilli* พบว่า *Lactobacilli* จะทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน(immunomodulators) โดยกระตุ้นภูมิต้านมานบางชนิดในทางเดินอาหาร

9. <u>รูปแบบของการใช้สารสริมชีวนะในอาหารสัตว์</u>

การใช้สารเสริมชีวนะหรือ โปรไบโอติก จะมีผลดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะ แต่สารเสริมชีวนะยังมีราคาสูง เพราะว่าสารเสริมชีวนะที่ผสมในอาหารสัตว์ผลิตอยู่ในรูปสารผสมในปัจจุบันที่นำเข้าจากต่างประเทศ เมื่อจะใช้จึงนำไปผสมกับอาหารสัตว์สำเร็จรูป ก่อนที่จะนำไปให้สัตว์กิน ทำให้เกษตรกรอาจไม่นิยมใช้ แต่โรงงานผลิตอาหารสัตว์สำเร็จรูปที่มีสารเสริมชีวนะผสมแทนการใช้สารปฏิชีวนะได้ การใช้สารเสริมชีวนะในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป โดยกำหนดให้มีเชื้อจุลินทรีย์ไม่น้อยกว่า 1×10^5 CFU ต่อน้ำหนักอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป 1 กรัม จุลินทรีย์สารเสริมชีวนะที่ใช้ผสมในอาหารสัตว์มี 2 รูปแบบ คือ การใช้เซลล์ที่มีชีวิต (vegetative form) และ การใช้ในลักษณะของสปอร์ (endospore form) ซึ่งพบว่าการให้เซลล์ที่มีชีวิต นิยมใช้ในอาหารสัตว์เดี่ยวเอื้อง หรือสัตว์สี่กระเพาะ เช่น วัว หรือ ควาย มากกว่าสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น ไก่ สุกร หรือ เป็ด ทั้งนี้เพราะสภาพที่เป็นกรดทางเดินอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว จะทำให้เชื้อที่มีชีวิตเปลี่ยนแปลงได้ก่อนที่จะผ่านไปถึงลำไส้ ทำให้สารเสริมชีวนะนั้นไม่สามารถให้ประโยชน์กับสัตว์เต็มที่ ดังนั้นลักษณะที่เหมาะสมกับสัตว์กระเพาะเดี่ยวควรจะเป็นการให้ในรูปสปอร์ เพราะสามารถทนต่อน้ำย่อยใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระเพาะได้ดี และทนต่อความร้อน นอกจากนี้ความร้อนและความชื้นในขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์ในกระบวนการอัดเม็ด (pellet) จะมีผลต่อลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิตด้วย เช่นกัน

10. หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะนั้น สามารถพิจารณาได้ต้องเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ก่อโรค โดยเป็นสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เข้าบ้าน สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง เช่น กระเพาะอาหารและสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งน้ำดีหลั่งมาจากตับอ่อน สามารถเพิ่มจำนวนและมีเมตาบอลิซึมในระบบทางเดินอาหารได้ ผลิตกรดอินทรีย์และสารต้านจุลชีพ ซึ่งมีผลลดจุลินทรีย์เกิดโรค เพาะเลี้ยงง่ายและเพิ่มจำนวนได้เร็ว ตลอดจนมีอัตราการรอดชีวิตสูง เมื่อเก็บรักษาระยะเวลานาน ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตเป็นจำนวนมากในระดับอุตสาหกรรมได้ ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร กระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานสลายพิษของเชื้อโรคหรือสารต้านโภชนะตัวอื่นๆที่อยู่ในอาหาร เช่น *Lactobacillus*

11. วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก

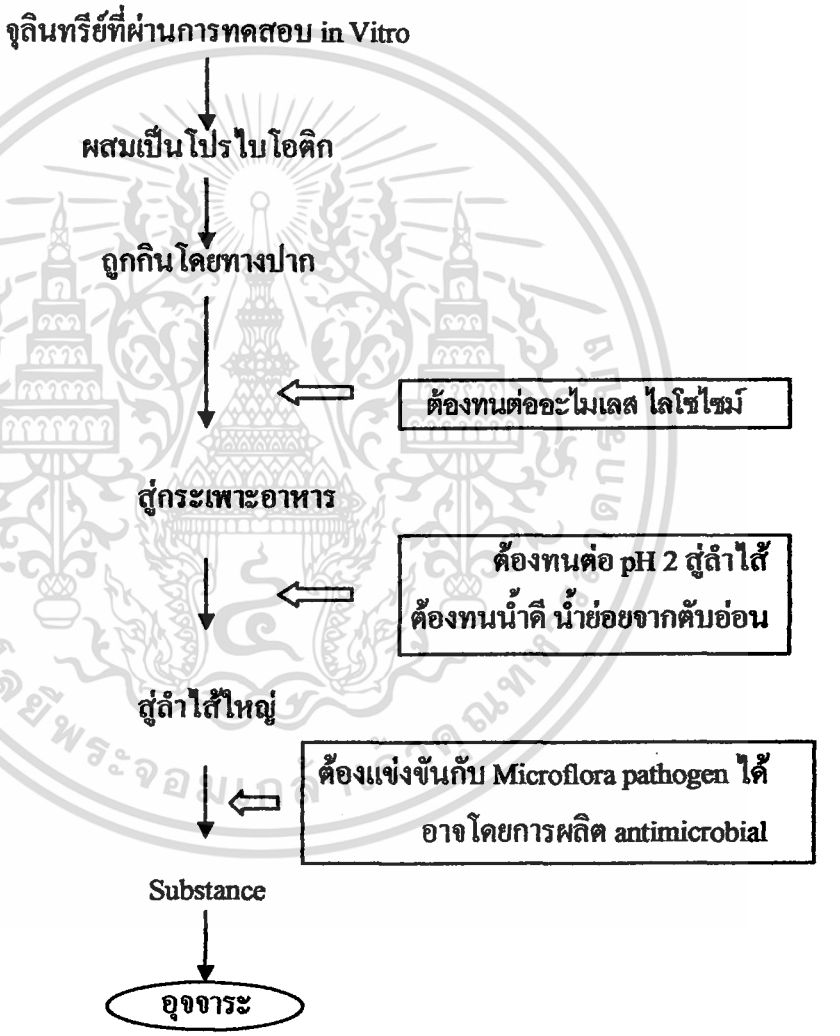
การพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกนั้น สิ่งสำคัญประกอบด้วย 2 ประการคือ()

1 .เป็นจุลินทรีย์ที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วๆไปและมีความปลอดภัยตลอดระยะเวลาในการใช้ทั้งระยะสั้นและระยะยาว ตามมาตรฐาน GRAS (Generally Recoqnized As Safe Microorganism)

2. เป็นจุลินทรีย์ที่มีความเฉพาะเจาะจง คือจุลินทรีย์ที่จะพิจารณาต้องระบุกลุ่มเป้าหมายที่จะนำไปใช้ให้ชัดเจนว่าในคนหรือสัตว์ประเภทใด ชนิดใด จุลินทรีย์นั้นจึงจะออกฤทธิ์หรือมีเมตาบอลิซึมให้ประโยชน์ตามที่ต้องการได้และการนำจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณเนื้อเยื่อใด ในสัตว์ชนิดใดก็มักแสดงผลบวกกับผู้ให้อาศัยชนิดเดียวกันด้วย ซึ่งอาจจะใช้ไม่ได้ผลกับสัตว์ชนิดอื่นซึ่งมีความแตกต่างกันออกไป เช่น ด้านสรีระของเยื่อบุผิว ระบบการย่อยอาหารและการดูดซึมอาหารในกระเพาะและลำไส้ รวมทั้งการยึดเกาะกับเยื่อบุผนังภายในร่างกาย การขยายพันธุ์ การได้ผลบวกในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการณ์ อาจจะไม่ได้ผลบวกในการทดลองกับสัตว์ทดลองหรือผลบวกทางคลีนิคก็เป็นได้ เนื่องจากสภาวะแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการใช้โปรไบโอติกเพื่อให้ผลตามที่มุ่งหวังนั้น จุลินทรีย์ที่ผ่านจากปากเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของร่างกายจะต้องรอดชีวิตและสามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผิวภายในอวัยวะต่าง ๆ ตามบริเวณต่าง ๆ หรือจุดจำเพาะเจาะจงที่ได้คัดเลือกสายพันธุ์ พร้อม ๆ มีการแข่งขันเจริญเติบโตกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นได้ มีการขยายเผ่าพันธุ์และผลิตสารเคมีที่เป็นประโยชน์ได้ จุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นต้นในห้องปฏิบัติการณ์ จะต้องได้รับการทดสอบจนมั่นใจในสัตว์ทดลองและในผู้บริโภค



<u>ภาพที่ 1</u> ขั้นตอนในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก
ที่มา : วลัยพร (2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติคผสมในอาหารสัตว์

1. ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนสารปฏิชีวนะ และเคมีภัณฑ์ ซึ่งอาจพบปัญหาการดื้อยาและสารตกค้าง

2. ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารสัตว์ดีขึ้น ทำให้การใช้น้ำตาลแลคโตสในนมดีขึ้น

3. ใช้ป้องกันโรคต่างๆเนื่องจากโปรไบโอติคทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น ลดการเกิดโรคท้องเสียในสัตว์ เมื่อสัตว์เกิดความเครียดจะมีผลทำให้สูญเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้

4. ยับยั้งหรือป้องกันการเกิดเนื้องอก โดยโปรไบโอติคจะช่วยยับยั้งการสร้างเซลล์เนื้องอกและลดการสร้างน้ำย่อยที่ใช้ในการสร้างสารไนโตรซามีน

5. ยับยั้งการสร้างคลอเรสเตอรอล

6. ใช้ได้กับสัตว์ทุกชนิด ทุกระยะ

7. FDA ยอมรับว่าเป็นGRAS

13. คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก มีรูปร่างแบบท่อน และแบบกลม อาจอยู่เดี่ยว ๆ หรือเกาะกันเป็นคู่หรือเรียงต่อกันเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดเจริญได้ดีในสภาวะกดดันสูง ที่อุณหภูมิ 5-50 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5.5-5.8 แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อสภาพที่มีวัตถุแห้งได้สูงสุดถึง 700 กรัมต่อกิโลกรัม (70 เปอร์เซ็นต์) หรือเมื่อมีความชื้นอยู่พียง 30 เปอร์เซ็นต์ Woolford (1990)

การจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นไปตาม Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology 9 th ed.1994 ดังนี้ Holt และคณะ (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20378

13.1 กลุ่มรูปร่างแบบท่อนกลม

ประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก สกุล *Enterococcus Lactobacillus Streptococcus Vagococcus Aerococcus Pediococcus Tetragenococcus* และ *Leuconoctoc*

13.2 กลุ่มรูปร่างแบบท่อนยาว

ประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus* และ *Carpobacterium* นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกจากความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกได้เป็น 2 จำพวก คือ

13.2.1.Homofermentative lactic acid bacteria

ผลิตภัณฑ์หลัก (main product) ที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ กรดแลคติก 80-90 เปอร์เซ็น ดังตารางที่ 4

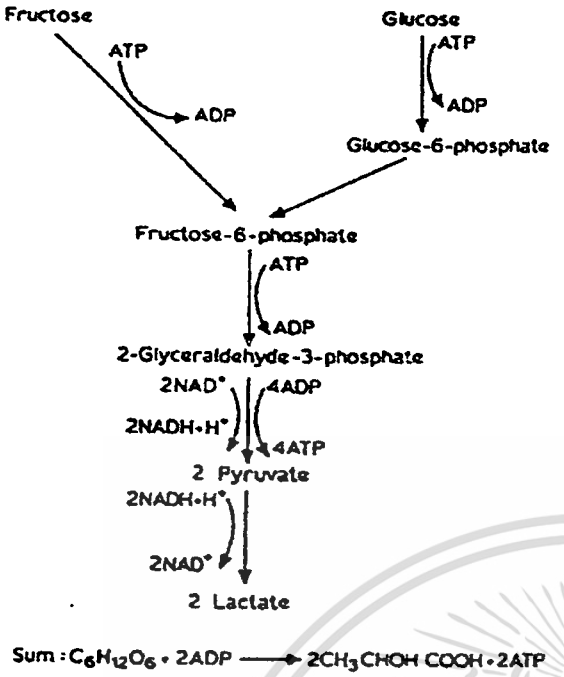
กระบวนการเมแทบอลิซึมดำเนินไปตามวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) หรือที่เรียกว่าวิถีเอมเดนเมอเยอฮอฟ พาร์นาส (Embden Meryerhof Parnas pathway) ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่4 ผลผลิตที่ได้จากการใช้น้ำตาลและกรดอินทรีย์ในการหมักของแบคทีเรียกลุ่ม ต่าง ๆ แสดงในรูปของโมลาร์

Substrate	Products	Comments
1 glucose	2 lactic acid	Homofermentation
1 fructose	2 lactic acid	Homofermentation
1 glucose	1 lactic acid, 1 acetic acid, 1 carbon dioxide	Heterofermentation
1 glucose	1 lactic acid, 1 ethanol, 1 carbon dioxide	Heterofermentation
3 fructose	1 lactic acid, 1 acetic acid, 2 mannitol, 1 carbon dioxide	Heterofermentation
1 xylose	1 lactic acid, 1 acetic acid	Homo and Hetero
2 citrate	3 acetic acid, 1 lactic acid, 3 carbon dioxide	Homo and Hetero
2 citrate	2 acetic acid, 4 carbon dioxide, 1 2,3-butanediol	Homo and Hetero
1 malate	1 lactate and 1 carbon dioxide	Homo and Hetero

ที่มา : Muck (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



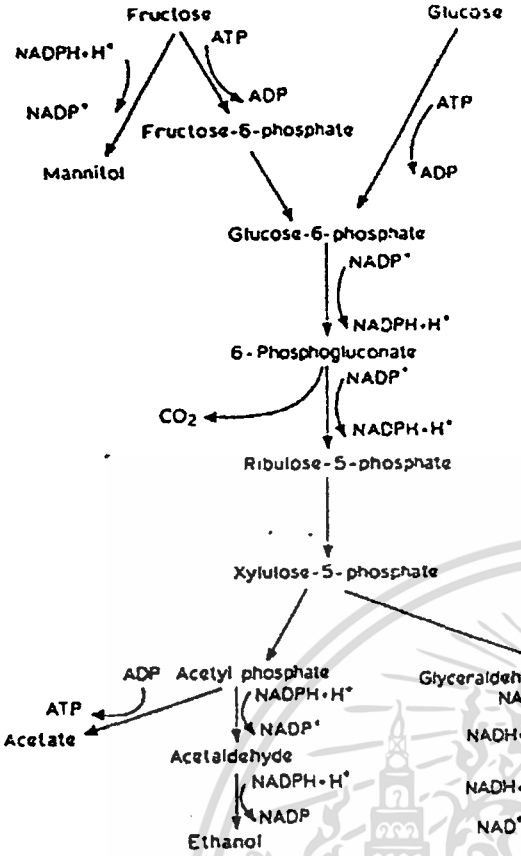
ภาพที่ 2 กระบวนการเมแทบอลิซึมโดยอาศัยกลูโคสและฟรุกโตสของ homofermemtative lactic acid bacteria โดย glycolysis pathway
ที่มา : Woolford (1985)

13.2.2.Heterofermemtative lactic acid bacteria

ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่มนี้คือกรดแลคติกในปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากนี้ยังประกอบด้วยกรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์ กระบวนการเมแทบอลิซึมดำเนินไปตามวิถีฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase pathway) ดังแสดงในภาพที่ 3

กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติก ในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Homofermemtative lactic acid bacteria สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่ากลุ่ม Heterofermemtative lactia acid bacteria เมื่อใช้กลูโคสและฟรุกโตสเป็นสารตั้งต้นประมาณ 2 เท่าตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสและฟรุกโตสของ heterofermemtative lactic acid bacteria โดย phosphoketolase pathway

ที่มา : Woolford (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. การจำแนกบักเตรีในสกุล *Pediococcus*

Breed และคณะ (1948) จัด *Pediococcus* ไว้เพียงสปีชีเดียว คือ *Pediococcus cerevisiae* ต่อมา Breed และคณะ (1957) จัดแบ่ง *Pediococcus* ออกเป็นสองชนิด โดยอาศัยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและความสามารถเจริญในเบียร์ คือ *Pediococcus cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส มีความสามารถเจริญได้ใน wort, hopped wort และในเบียร์กับ *Pediococcus acidilactici* ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีความสามารถเจริญใน unopped wort แต่ไม่มีความสามารถเจริญในเบียร์

Yamazato (1958) และ Sakaguchi (1958) ได้ให้ชื่อ *Pediococcus soyae* สำหรับบักเตรี *Pediococcus* ที่แยกได้จากน้ำหมักซีอิ๊ว (miso) และเป็นบักเตรีที่มีความสามารถในการทนเกลือได้สูงถึง 25 – 26 เปอร์เซ็นต์

Nakagawa และ Kitahara (1959) ได้อาศัยความแตกต่างของ pH อุณหภูมิในการเจริญ การสร้างเอนไซม์คาตาเลส ความต้องการออกซิเจน ความต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ ความทนเกลือ ความทนต่อ hop ตลอดจนความสามารถในการใช้น้ำตาลแบ่ง *Pediococcus* ออกเป็น 5 ชนิด คือ *Pediococcus cerevisiae* , *Pediococcus acidilactici* , *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus urinae – equi* และพวกที่ทนเกลือ คือ *Pediococcus halophilus* ซึ่งรวมเอา *Pediococcus halophilus* Mess, 1934 ซึ่งแยกจาก anchovy pickles และ *Pediococcus soyae* (Sakaguchi) (1958) เข้าได้ด้วย

Deibel และ Niven (1960) ได้จัด *Gaffkya homari* และ *Pediococcus viridans* ที่แยกได้จาก cured meat และ meat curing brine ไว้ในพวก *Pediococcus homari* ซึ่งเป็นสปีชีใหม่ โดยให้เหตุผลว่าบักเตรีทั้งสองมีลักษณะคล้ายกันมา และมีลักษณะไปทางสกุล *Pediococcus* คือเป็นพวก homofermentative ไม่สามารถใช้ไนเตรท เจริญได้เล็กน้อยบนพื้นผิวของอาหารวุ้น ไม่สามารถย่อยโปรตีน ส่วนมากเรียงตัวกันเป็นสี่เซลล์ คาตาเลสลบเป็นพวก facultative หรือ microaerophile มีความสามารถทนเกลือ สร้าง dextrorotatory lactic acid

Pederson (1949) Gunther และ White (1961), Coster และ White (1964) Gibbs และ Skinner (1966) ได้อาศัยคุณสมบัติและคุณลักษณะต่าง ๆ ของ *Pediococcus* แบ่งบักเตรีนี้ออกเป็น 5 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Whittenbury (1965) อาศัยหลักการของ Nakagawa และ Kitahara (1959) จัดแบ่งบักเตรี *Pediococcus* ออกเป็น 4 ชนิด คือ *Pediococcus cerevisiae, Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus halophilus* ส่วน *Pediococcus urinae – equi* เขาจัดไว้ในพวก *Aerococcus viridans* โดยให้เหตุผลว่าบักเตรีนี้ชอบสภาพมีอากาศในการเจริญผลิตกรดได้น้อยใน glucose broth และเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีน้ำตาล

Sakaguchi และ Mori (1969) พบว่า *Pediococcus halophilus Pediococcus soyae* และ *Pediococcus homari* มีความคล้ายคลึงกันทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะความต้องการธาตุอาหาร ตลอดจนค่า T_m ของ DNA จึงควรจัดไว้เป็นชนิดเดียวกัน ส่วน *Pediococcus urinae – equi* นั้น มีความคล้ายคลึงกับสามสปีชีแรก โดยเฉพาะเรื่องความต้องการธาตุอาหาร แต่มีข้อแตกต่างในด้านการทนเกลือและจัดรวม *Aerococcus viridans* ไว้ใน *Pediococcus urinae – equi* โดยให้เหตุผลว่าบักเตรีทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ตลอดจนความต้องการธาตุอาหารคล้ายกัน

ต่อมา Buchanan และคณะ (1974) ได้อาศัยหลักการจัดแบ่งของ Nakagawa และ Kitahara (1959) จัดแบ่งบักเตรี *Pediococcus* ออกเป็น 5 ชนิด โดยแบ่งได้เป็นพวกใหญ่ ๆ 2 พวก คือ

1. พวกที่เจริญได้ที่ pH 5.0 แต่ไม่เจริญที่ pH 9.0 มีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด

    ก. พวกที่ไม่เจริญที่ pH 7.0 หรืออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ชอบลักษณะที่เป็น anaerobic condition จัดไว้ใน *Pediococcus cerevisiae*

    ข. พวกที่สามารถเจริญได้ที่ pH 7.0 หรือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเป็น microaerophilic ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 พวก

        ๑. สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จัดไว้ใน *Pediococcus acidilactici*

        ๒. ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จัดไว้ใน *Pediococcus pentosaceus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. พวกที่ไม่สามารถเจริญที่ pH 5.0 แต่สามารถเจริญที่ pH 9.0

ก. ชอบเกลือ (halophilic) จัดไว้ใน *Pediococcus halophilus*

ข. ไม่ชอบเกลือ (non halophilic) ได้แก่ *Pediococcus urinae – equi*

15. อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของบักเตรีในสกุล Pediococcus

โดยทั่วไปบักเตรีที่ผลิตกรดและแลคติคนี้เป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงค่อนข้างยาก เนื่องจากมีความต้องการธาตุอาหารค่อนข้างสมบูรณ์ และสลับซับซ้อนในการเจริญ (Prescott และ Dunn, 1959 และ Tittsler และคณะ 1952) มีความต้องการอาหาร เกลือแร่ กรดอะมิโน และไวตามินหลายชนิด โดยเฉพาะไวตามิน B – complex นอกจากนี้ยังต้องการพวก organic growth factor เช่น adenine quanine และ uracil อีกด้วย (Tittsler และคณะ 1952 และ Rogosa และคณะ 1961)

15.1 แหล่งธาตุคาร์บอน

แหล่งธาตุคาร์บอน คือ สารประกอบที่ให้คาร์บอนไปใช้ประโยชน์ในการเสริมสร้างซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเซลจุลินทรีย์ได้ (Martin และ Batt, 1957) แหล่งคาร์บอนและพลังงานในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์พวก heterotrophs ทั่ว ๆ ไปมักจะมีสารเดียวกัน (Frobisher และคณะ. 1974) สำหรับแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนของบักเตรีแลคติคจะเป็นพวกคาร์โบไฮเดรตที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น น้ำตาลกลูโคสแลคโตส ซูโครส เป็นต้น (Tittsler และคณะ 1952) Buchanan และคณะ (1974) รายงานว่าบักเตรี *Pediococcus* สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และแมนโนส แต่ไม่สามารถใช้ซอร์บิตอลและแป้ง Dolezil และ Kirsop (1977) พบว่า บักเตรี *Pediococcus* จะใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส แมนโนส เซลโบไบโอส ทรีฮาโลส และ เอ็น – อะเซททีล กลูโคซาไมน์ เป็นแหล่งธาตุคาร์บอนและพลังงานได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15.2 แหล่งธาตุไนโตรเจน

แหล่งธาตุไนโตรเจน คือ สารประกอบที่ให้ไนโตรเจนไปใช้ประโยชน์ในการเจริญและเสริมสร้างหรือซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเซลล์ (Date, 1971) แหล่งธาตุไนโตรเจนของบักเตรีแลคติคมักจะเป็นกรดอะมิโน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น essential amino acid แต่ก็มีบางชนิดสามารถใช้ peptide ได้ (Tittsler และคณะ 1952) ส่วนเกลือแอมโมเนียนั้น พวก *Pediococcus* ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนไม่ได้ (Gunther และ White, 1961) แต่ก็มีพวก *Lactobacillus helveticus* ที่สามารถใช้เกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนเพื่อนำไปสร้าง non – essential amino acid และสารประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในไซโตปลาสซึม

15.3 แหล่งของ growth factor

จุลินทรีย์ต้องการ growth factor ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินต่าง ๆ ได้ แต่บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินบางอย่างขึ้นใช้ได้ จึงจำเป็นต้องเติมวิตามินเหล่านั้นลงในอาหาร Eddy (1941) บักเตรีแลคติคต้องการวิตามิน และ growth factor ค่อนข้างเฉพาะลงไป แล้วแต่ชนิดของเชื้อ Jensen และ Seeley (1953) พบว่าบักเตรี *Pediococcus* มีความต้องการ citrovorum factor, niacin และ pantothenic acid ในการเจริญ ส่วน biotin และ pyridoxine นั้นเป็นเพียงตัวเร่งในการเจริญเท่านั้น นอกจากนี้เขายังได้ศึกษาถึงความต้องการธาตุอาหารของ *Pediococcus* ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 Nakagawa และ Kitahara (1959) พบว่า *Pediococcus* โดยทั่วไปมีความต้องการพวก niacin, pantothenic acid และ biotin หรือ tween 80 บางสายพันธุ์ต้องการ organic base riboflavin และ peptide like substance (P – factor) ในการเจริญ

15.4 เกลือแร่

บักเตรีแลคติคส่วนใหญ่ต้องการ K^{+}, Mn^{++} และ $PO_4^{=}$ ในปริมาณค่อนข้างมาก (Tittsler และคณะ 1952) และบางชนิดยังต้องการ Mg^{++} Sr^{++} Ca^{++} Rb^{+} ซึ่งความต้องการอนุมูลโลหะต่าง ๆ นี้จะแตกต่างกันระหว่างบักเตรีแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของบักเตรี *Pediococcus*

16.1 อิทธิพลของอุณหภูมิการเจริญของบักเตรี *Pediococcus* sp.

ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์จะเป็นลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์แต่ละชนิด Davis และคณะ 1968 และ Buchanan และคณะ (1974) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเจริญของ *Pediococcus cerevisiae* อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส และบักเตรีนี้ไม่เจริญที่ 35 องศาเซลเซียส *Pediococcus acidilactici* จะเจริญอยู่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส *Pediococcus pentosaceus* จะเจริญอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 40 – 45 องศาเซลเซียส ส่วน *Pediococcus urinae – equi* จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ คือ 42 องศาเซลเซียส สำหรับ *Pediococcus halophilus* Nakagawa และ Kitahara (1959) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ที่ 25 – 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้จะอยู่ต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส Sakaguchi (1959) รายงานว่า *Pediococcus soyae* ซึ่งเป็นพวกเดียวกับ *Pediococcus halophilus* (Nakagawa และ Kitahara, 1959) ที่แยกได้จากน้ำหมักซีอิ๊วญี่ปุ่นจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส แต่จะไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส Gunther และ White (1961) พบว่า *Pediococcus halophilus* สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส Coster และ White (1964) พบว่า *Pediococcus halophilus* มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญอยู่ระหว่าง 10 – 40 องศาเซลเซียส Whittenbury (1965) พบว่า *Pediococcus halophilus* สามารถเจริญได้ที่ 40 องศาเซลเซียส แต่จะไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส Saisithi (1967) พบว่า *Pediococcus halophilus* ที่แยกได้จากน้ำปลาไทยจะเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ Buchanan และคณะ (1974) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของบักเตรี *Pediococcus halophilus* จะอยู่ระหว่าง 25 – 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ คือ 40 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16.2 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเจริญของบักเตรี *Pediococcus* sp.

ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) มีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ ถ้าต่ำกว่านั้นหรือสูงกว่านั้นจะไม่มีการเจริญเลย หรือเจริญก็เจริญไม่ดีเท่าในช่วง pH ที่เหมาะสม (Okinsky และ Unmreit, 1959)

Buchanan และคณะ (1974) รายงานว่าบักเตรี *Pediococcus cerevisiae* จะเจริญได้ในช่วง pH 3.5 – 6.2 และจะเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 5.5 Nakagawa และ Kitahara (1959) พบว่า *Pediococcus acidilactici* จะเจริญได้ดีที่ pH 6.0 ส่วน pH ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 3.5 – 3.8 และ pH สูงสุดที่เจริญได้อยู่ที่ 8.0 ส่วน pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* อยู่ที่ pH 7.0 และ pH 8.0 เป็น pH สูงสุดที่สามารถเจริญได้ *Pediococcus urinae - equi* จะเจริญได้ที่ pH 9.0 และ pH สูงสุดที่เจริญได้ คือ 9.6 ส่วน *Pediococcus halophilus* จะเจริญได้อยู่ที่ 9.2 Sakaguchi (1959) พบว่า *Pediococcus soyae* ในน้ำหมักซีอิ๊วญี่ปุ่นจะเจริญได้ในช่วง pH 5.5 – 9.0 Coster และ White (1964) พบว่า *Pediococcus halophilus* สามารถเจริญได้ที่ pH 8.6 แต่ไม่สามารถเจริญที่ pH 4.4 Whittenbury (1965) พบว่า *Pediococcus halophilus* สามารถเจริญได้ที่ pH 5.0 และ 8.0 แต่ไม่สามารถเจริญที่ pH 9.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ NaCl
2. แคลเซียมคาร์บอเนต $CaCO_3$
3. Skimmed milk

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Ultra centrifuge)
2. เครื่องเขย่า
3. จานเพาะเชื้อ
4. ปิเปตขนาด 1 ml.
5. หลอดทดลองขนาด (150 x 16) + ฝา
6. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
7. ที่วางหลอดทดลอง
8. flask ขนาด 250 ml.
9. แท่งแก้วรูปตัวแอล
10. เครื่องชั่ง
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. anaerobic jar
13. incubator

เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดลอง

1. *Pediococcus acidilactici* (LAB 4)
2. *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536
3. *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1)เป็นตัว control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิธีการทดลอง

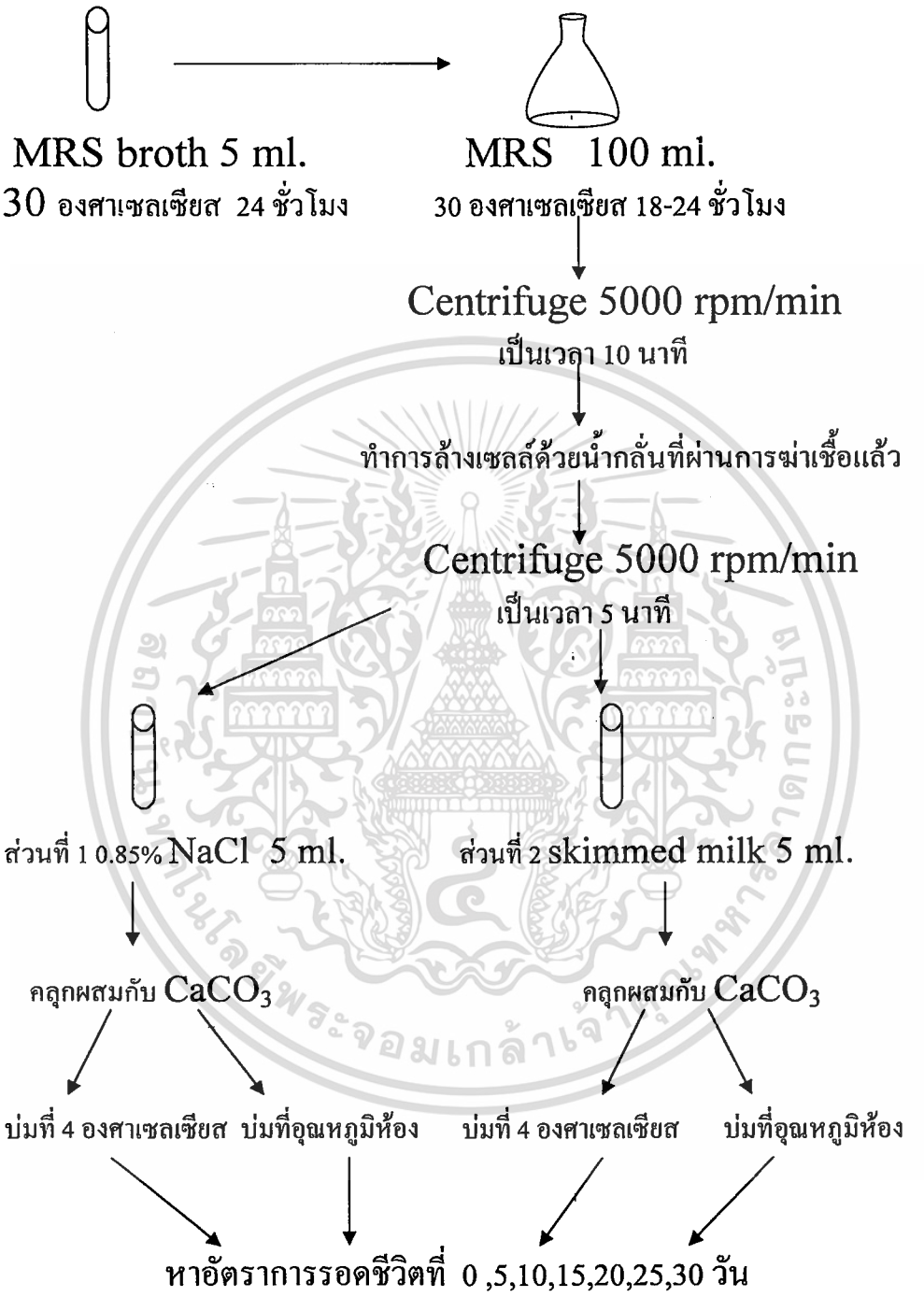
การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม

1. นำเชื้อ *Pediococcus acidilactici* *Pediococcus pentosaceus* และ *Lactobacillus acidophilus* มาเลี้ยงเชื้อแบบ deep tube ในอาหาร MRS agar + 1.0 % Calcium carbonate บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตบริเวณ clear zone
2. ทำการเลี้ยงขยายหัวเชื้อ โดยใช้เข็มเขี่ยบริเวณ clear zone มาใส่ใน flask ที่บรรจุอาหาร MRS เข้าเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
3. นำเชื้อจาก flask แต่ละ flask มาทำการแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm/min เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปหมุนเหวี่ยงต่อเป็นเวลา 5 นาที
4. แบ่งเชื้อที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ผสมกับ 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ 5 ml. และส่วนที่ 2 ผสมกับ skimmed milk 5 ml.
5. นำแต่ละส่วนมาคลุกกับ แคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัม คลุกให้เข้ากัน
6. แบ่งครึ่งแคลเซียมคาร์บอเนตที่คลุกให้เข้ากันแล้ว แยกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
7. ทำการตรวจวิเคราะห์การรอดชีวิตที่ 0,5,10,15,20,25,30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม

เชื้อที่ใช้ *Pediococcus acidilactici* (LAB4) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1)



ภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะจำลองกระเพาะสัตว์และสภาวะจำลองลำไส้สัตว์

ในสภาวะกระเพาะสัตว์ (Gastric juice)

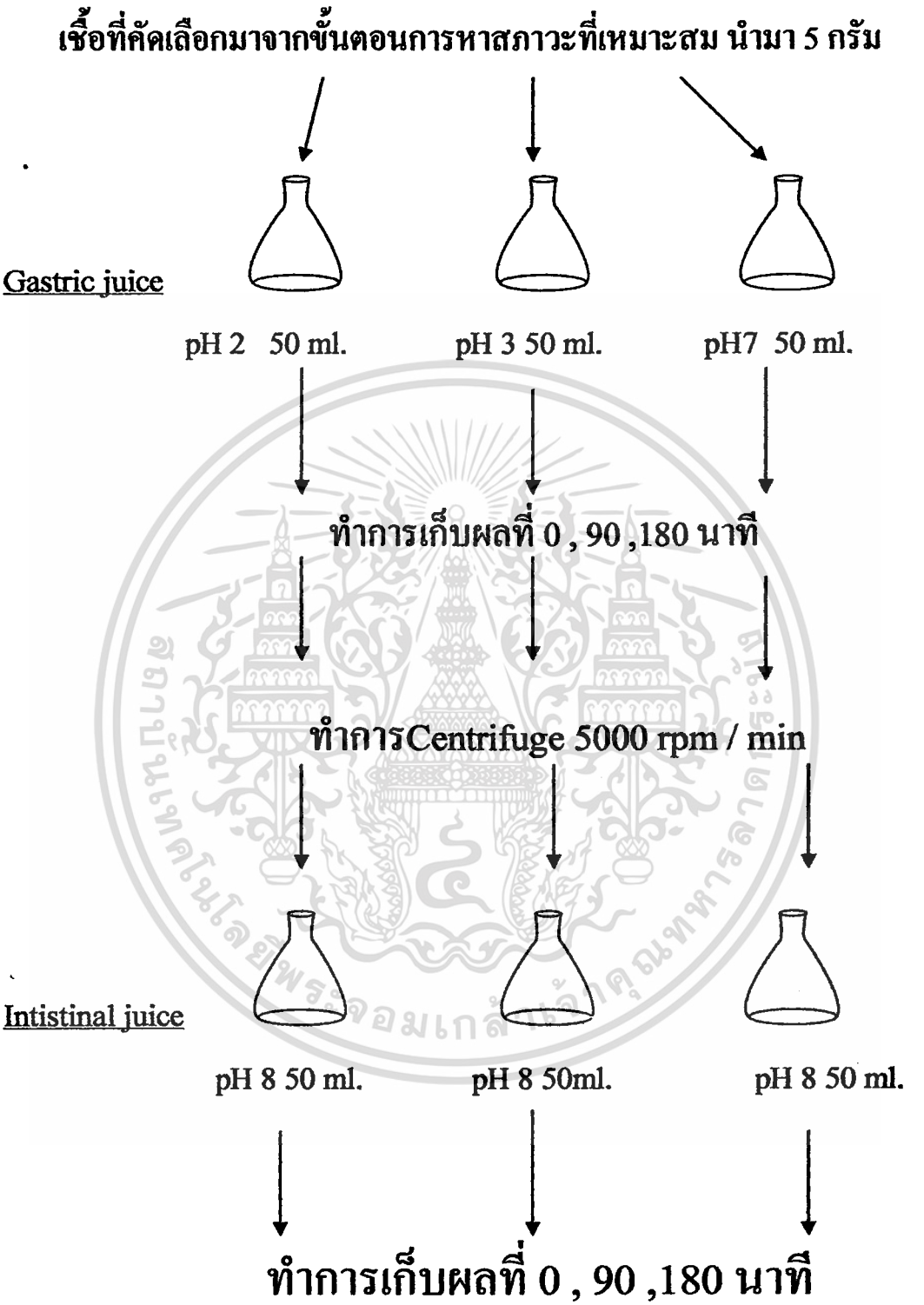
1. คัดเลือกเชื้อที่มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดจากการทดลองในขั้นหาสภาวะที่เหมาะสม
2. เตรียมสภาวะจำลองที่คล้ายกระเพาะสัตว์ โดนใส่ (NaCl 7.305 g/l , KCl 0.522 g/l , $NaHCO_3$ 3.781 g/l , Pepsin 3 g/l) flask ละ 50 ml. โดยใน flask ที่ 1 ปรับ pH ให้เป็น 2 , flaskที่ 2 ปรับ pH ให้เป็น 3 และ flask ที่ 3 ปรับ pH ให้เป็น 7
3. ตักเชื้อผงที่คลุกกับ $CaCO_3$ มา 5 g ใส่ลงในแต่ละ flask
4. ทำการเก็บผลที่ 0 ,90 ,180 นาที

ในสภาวะลำไส้ (Intistinal juice)

1. เตรียมสภาวะคล้ายลำไส้ โดยใส่ (0.1 % Pancreatin , 0.15 % Bile salt) ใน 3 flask flask ละ 50 ml. ปรับ pH ให้ได้ 8 ทั้ง 3 flask
2. นำเชื้อจากขั้นตอนในสภาวะกระเพาะสัตว์มาทำการหมุนเหวี่ยงที่ 5000 rpm / min
3. นำเชื้อที่ได้ใส่ลงใน flask จำลองสภาวะลำไส้
4. ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ 0 , 90 ,180 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการจำลองสภาวะกระเพาะและลำไส้สัตว์



ภาพที่ 7 แสดงขั้นตอนการจำลองสภาวะกระเพาะและลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์

จากการทดลองในขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เชื้อ 3 ชนิด คือ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และเชื้อ Lactobacillus *acidophilus* (LAB 1) ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับเชื้อ *Pediococcus* โดยที่เชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก โดยนำมาทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ / นาที และทำการละลายเชื้อโดยใช้สื่อ 2 ชนิด คือ 0.85 %โซเดียมคลอไรด์ และ skimmed milk จากนั้นนำมาผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนตที่เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ แล้วทำการแยกเก็บเป็น 4 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ผสม skimmed milk เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 32 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 ผสม skimmed milk เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 3 ผสม โซเดียมคลอไรด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนที่ 4 ผสมโซเดียมคลอไรด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำทั้ง 4 ส่วนบ่มไว้ประมาณ 30 วันจะให้ผลดังตารางดังในตารางที่ 5 ตารางที่ 6 และตารางที่ 7

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร) ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

วันที่	จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร)			
	536+skimmed milk อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	536+skimmed milk อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	536+NaCl อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	536+NaCl อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส
0	1.72×10^9	6.5×10^9	1.2×10^9	6.5×10^9
5	1.7×10^9	1.53×10^9	1.35×10^9	6.1×10^8
10	1.18×10^9	1.2×10^9	1.91×10^9	4.8×10^6
15	1.2×10^9	1.18×10^9	1.15×10^7	5.8×10^5
20	1.17×10^9	6.7×10^8	3×10^6	3×10^5
30	1.1×10^9	4.3×10^5	6.6×10^5	2.8×10^4

จากตารางที่ 5 จะพบว่าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผสม skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด เมื่อเก็บไว้ประมาณ 30 วัน คือ ประมาณ 10^9 CFU / ml ส่วนที่มีการผสมด้วยโซเดียมคลอไรด์ และเก็บที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีการรอดชีวิตที่น้อยที่สุด คือประมาณ 10^4 CFU / ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร) ของเชื้อ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4)

วันที่	จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร)			
	LAB 4 + skimmed milk อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	LAB 4 + skimmed milk อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	LAB 4 + NaCl อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	LAB 4 + NaCl อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส
0	5.9×10^8	1.36×10^9	9.9×10^8	1.36×10^9
5	3.1×10^8	8.2×10^8	8.9×10^8	7.8×10^8
10	2.3×10^8	6.2×10^8	5.7×10^8	4.1×10^5
15	1.6×10^8	5.5×10^8	1.33×10^7	4.2×10^5
20	1.4×10^8	2.9×10^8	2.3×10^6	3.3×10^5
30	9.5×10^7	1.5×10^6	9×10^5	7.2×10^4

จากตารางที่ 6 พบว่าจะให้ผลที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 โดยในส่วนที่มีการผสม skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด เมื่อเก็บไว้ประมาณ 30 วัน คือประมาณ 10^7 CFU / ml และในส่วนที่มีการผสมด้วยโซเดียมคลอไรด์ เก็บที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีการรอดชีวิตที่น้อยที่สุด คือประมาณ 10^4 CFU / ml

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร) ของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB1)

วันที่	จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร)			
	LAB 1 + skimmed milk อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	LAB 1 + skimmed milk อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	LAB 1 + NaCl อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	LAB 1 + NaCl อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส
0	4.3×10^8	1.12×10^8	4.3×10^8	1.12×10^8
5	3.8×10^4	3.2×10^4	1.12×10^4	3.6×10^3
10	2.2×10^2	< 10	< 10	< 10
15	$< 30 \times 10$	< 10	< 10	< 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 7 พบว่าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำ คือประมาณแค่ 5-10 วันเท่านั้น ส่วนเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ที่ผสม skimmed milk มีอัตราการรอดชีวิตที่นานที่สุด คือประมาณ 10-15 วัน

จากผลการทดลองในตารางของเชื้อ 3 เชื้อ พบว่า เชื้อ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1)ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* จะมีอัตราการรอดชีวิตแค่ประมาณ 5-10 วันเท่านั้น ก็จะไม่พบการรอดชีวิต ถึงแม้จะทำการผสมกับ skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก็ตาม ก็สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้แค่ประมาณ 15 วัน ต่างกับเชื้อ *Pediococcus* ทั้ง 2 ตัว ที่สามารถมีการรอดชีวิตถึงแม้ว่าจะทำการเก็บไว้แล้ว 30 วัน ทั้งนี้เนื่องมาจากความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือเชื้อ *Pediococcus* จะมีลักษณะเป็น cocci ส่วนเชื้อ *Lactobacillus* จะมีลักษณะเป็น rod ดังนั้นการเลือกใช้เชื้อ *Pediococcus* ในการนำมาทำอาหารสัตว์ จึงน่าจะให้ผลดีกว่าการใช้เชื้อ *Lactobacillus* เพราะสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานกว่า ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำมาผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก และจากการทดลองพบว่า เชื้อที่มีการผสม skimmed milk จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าการใช้ 0.85% NaCl หรือใช้น้ำเกลือเจือจาง ทั้งนี้เพราะ skimmed milk จะช่วยห่อหุ้มเซลล์ป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ ในสภาวะการผลิตแบบผงซึ่งเป็นแบบแห้ง ทำให้สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานกว่า ส่วนในการเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก็ทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องหรือประมาณ 32 องศาเซลเซียส เพราะการเก็บที่อุณหภูมิเย็นจะช่วยชะลอการเมแทบอลิซึมของเซลล์ลง ทำให้สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้เชื้อ *Pediococcus* ผสมกับ skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด และเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์โปรไบโอติก ซึ่งจะช่วยให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรงและทำให้มีผลผลิตในฟาร์มสูงขึ้นด้วย

หมายเหตุ

LAB 4 คือ เชื้อ *Pediococcus acidilactici*

536 คือเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

LAB 1 คือเชื้อ *Lactobacillus acidophilus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองในขั้นตอนการจำลองสภาวะกระเพาะและลำไส้ โดยคัดเลือกเชื้อที่มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดจากขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมมาทำการทดลองผ่านสภาวะจำลองกระเพาะอาหารที่ ค่า pH 2 , pH 3 และ pH 7 ดูอัตราการรอดชีวิตของเชื้อจากนั้นนำมาผ่านสภาวะจำลองลำไส้ดูอัตราการรอดชีวิตของเชื้อว่าเมื่อผ่านสภาวะทั้งกระเพาะและลำไส้แล้วเชื้อจะสามารถมีชีวิตรอดได้หรือไม่ จากการทดลองเราได้นำเชื้อ *Pediococcus acidilacticii* (LAB 4)ที่ผสม skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 เซลเซียส และเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผสม skimmed milk และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ได้มาจากการทดลองในขั้นตอนหาสภาวะที่เหมาะสมมาทำการทดลองต่อในขั้นตอนการจำลองกระเพาะและลำไส้สัตว์ซึ่งจะให้ผลดังตารางที่ 8 และตารางที่ 9 ดังนี้

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตในสภาวะกระเพาะและลำไส้โดย จุลินทรีย์ที่นำมาทดลองคือเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ผสม skimmed milk บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อเริ่มต้นประมาณ 3×10^{10} CFU/ml

สภาวะ	เวลา (นาที)	ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะและลำไส้		
		pH 2	pH 3	pH 7
Gastric juice กระเพาะอาหาร	0	6.3×10^{9}	3×10^{8}	7.9×10^{9}
	90	8.5×10^{7}	1.3×10^{8}	5×10^{9}
	180	1.05×10^{7}	7.7×10^{6}	3.6×10^{8}
สภาวะ	เวลา(นาที)	pH 8	pH 8	pH 8
Intistinal juice ลำไส้	0	1.05×10^{7}	7.7×10^{6}	3.6×10^{8}
	90	5.8×10^{6}	5.2×10^{6}	9.6×10^{6}
	180	2.7×10^{5}	2.6×10^{5}	6.7×10^{6}

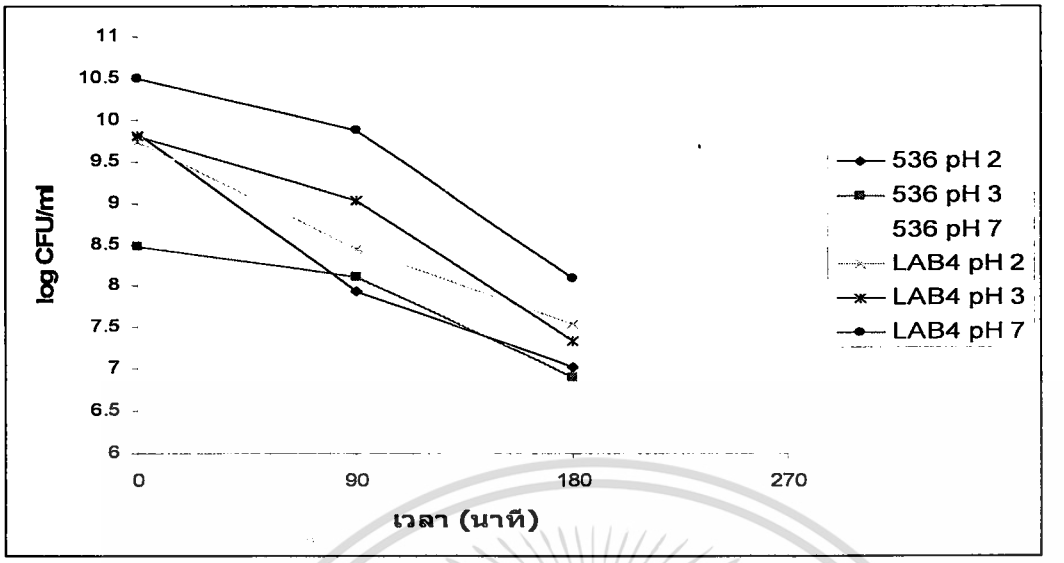
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตในสภาวะกระเพาะและลำไส้โดย จุลินทรีย์ที่นำมาทดลองคือเชื้อ *Pediococcus acidilacticii* (LAB 4)ผสม skimmed milk บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อเริ่มต้นประมาณ 6.9×10^{10} CFU/ml

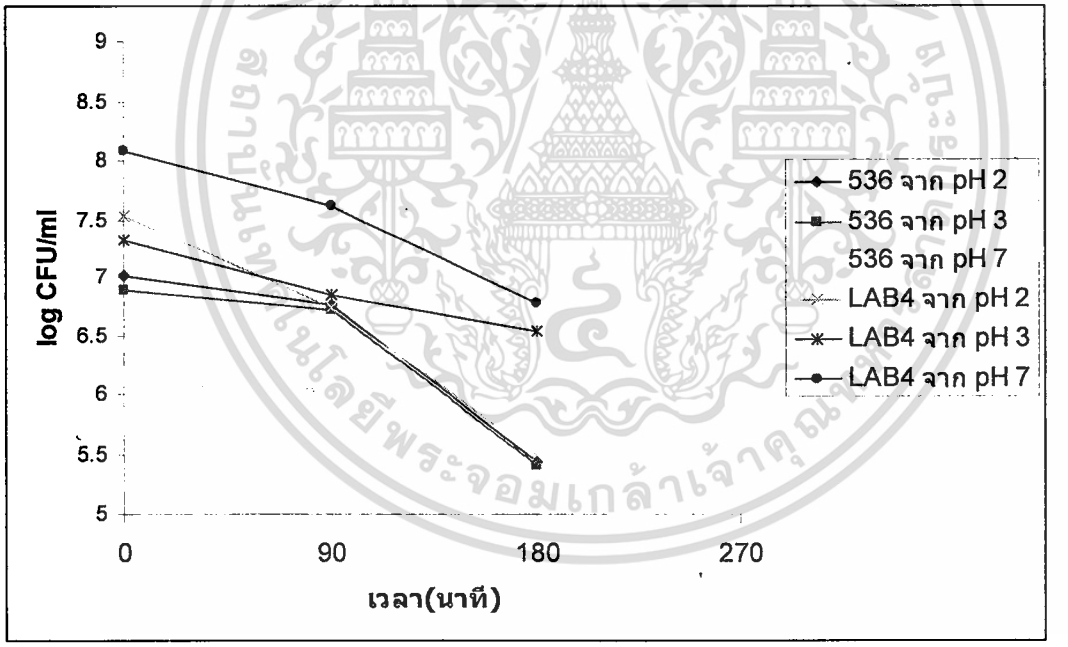
สภาวะ	เวลา (นาที)	ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะและลำไส้		
		pH 2	pH 3	pH 7
Gastric juice กระเพาะอาหาร	0	5.6×10^{9}	6.5×10^{9}	3.2×10^{10}
	90	2.8×10^{8}	1.1×10^{9}	7.6×10^{9}
	180	3.5×10^{7}	2.1×10^{7}	1.2×10^{8}
สภาวะ	เวลา(นาที)	pH 8	pH 8	pH 8
Intistinal juice ลำไส้	0	3.5×10^{7}	2.1×10^{7}	1.2×10^{8}
	90	5.4×10^{6}	7.1×10^{6}	4.2×10^{7}
	180	3.1×10^{5}	3.5×10^{6}	6×10^{6}

จากตารางที่ 8 และตารางที่ 9 พบว่า เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และเชื้อ *Pediococcus acidilacticii* (LAB 4)ที่นำมาทำการทดลองมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะกระเพาะที่มีความเป็นกรดสูง คือที่ pH 2 , pH 3 และสภาพที่เป็นกลางคือ pH 7 และสามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยที่ pH 7 จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด คือประมาณ 10^{8} และเมื่อนำมาทำการทดลองต่อในขั้นตอนผ่านสภาวะจำลองลำไส้ที่มีค่า pH 8 พบว่าเชื้อที่มาจาก 3 ปัจจัยสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในสภาวะจำลองลำไส้ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูงโดยสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ ประมาณ 10^{5}-10^{6} CFU/ml ซึ่งถือว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่สูง และจัดว่ามีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกที่ดี คือสามารถผ่านระบบทางเดินอาหารและสามารถจะมีชีวิตรอดอยู่ได้ในลำไส้ ทำให้ลดปริมาณของเชื้อก่อโรคที่จะไปเกาะและก่อตัวในลำไส้ลงได้โดยจะไปแย่งจับพื้นที่ภายในผนังลำไส้ของสัตว์ ช่วยให้สัตว์แข็งแรงเป็นโรคน้อยลง ลดปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะที่อาจตกค้างในสัตว์ ไม่ทำให้เกิดการดื้อยา และทำให้มีผลผลิตในฟาร์มที่สูงขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา(นาที)กับ log CFU/ml ในสภาวะ จำลอง กระเพาะอาหาร



ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา(นาที)กับ log CFU/ml ในสภาวะ จำลองลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

โปรไบโอติก (Probiotic) หรือสารเสริมชีวนะ จัดเป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและมีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ในการเลี้ยงสัตว์จำนวนมากมักจะเกิดปัญหาภาวะโรคติดเชื้อในระบบต่าง ๆ อันมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง การใช้โปรไบโอติกเพื่อให้มีกลไกควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เพราะโปรไบโอติกจะช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค สามารถจับกับผนังของลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคไม่สามารถเกาะ และก่อตัวในทางเดินอาหารได้ ช่วยระบบย่อยอาหารดีขึ้น สร้างน้ำย่อย ลดพิษของ amine และ แอมโมเนีย กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคโดย ทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสภาวะสมดุลเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร ให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

จากการทดลองในขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าพบว่าเชื้อ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) , *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผสม skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด ส่วนที่ผสมด้วยโซเดียมคลอไรด์และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตที่สูง แต่น้อยกว่าส่วนที่ผสม skimmed milk เพราะ skimmed milk จะช่วยป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ซึ่งดีกว่าการใช้น้ำเกลือเจือจางหรือโซเดียมคลอไรด์ การเก็บที่อุณหภูมิต่ำคือ 4 องศาเซลเซียสดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องคือประมาณ 32 องศาเซลเซียส เพราะช่วยลดอัตราการเมแทบอลิซึมของเชื้อลง ทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดได้นานขึ้น จากการทดลองโดย นำเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB1)ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกเหมือนกันมาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับเชื้อ *Pediococcus* โดยผสมในแคลเซียมคาร์บอเนตและทำการทดลองเช่นเดียวกับเชื้อ *Pediococcus* พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำมาก ดังนั้นการใช้เชื้อ *Pediococcus* มาผสมลงในอาหารสัตว์จึงดีกว่าการใช้เชื้อ *Lactobacillus* และเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยให้สัตว์ที่บริโภคเข้าไปมีสุขภาพแข็งแรง ทนต่อโรค และมีผลผลิตสูงขึ้นด้วย

จากการทดลองในขั้นตอนจำลองสภาวะกระเพาะและลำไส้สัตว์โดยนำเชื้อที่มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดจากขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมนั่นคือเชื้อ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) , *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผสม skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถทนต่อสภาวะกระเพาะที่มีความเป็นกรดสูง คือ pH 2 และ pH 3 และสามารถมีชีวิตรอดในสภาวะลำไส้ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูงได้ในระดับสูง ซึ่งจัดเป็นคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ดีคือมีอัตราการรอดชีวิตที่สูง เมื่อผ่านระบบทางเดินอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรให้มีการทดลองทำในกระเพาะสัตว์จริง ๆ เพื่อดูอัตราการรอดชีวิตของเชื้อว่าสามารถมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหารได้หรือไม่

2. ควรทำการทดลองนำเชื้อหลาย ๆ ตัวที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกมาทำการทดลองเปรียบเทียบกันว่าจะสามารถนำมาทำเป็นอาหารสัตว์โปรไบโอติกได้หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

บุญเรียง ล้ำวัยภูมิ.2544. "การคัดเลือกและผลิตสารจุลินทรีย์เพื่อเป็นสารเสริมชีวนะใช้ในการเลี้ยงไก่." วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วลัยพร ทิมบุญธรรม.2544. "การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม."วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วรุจา มาลัยพวง.2544. "การผลิตโปรไบโอติกสำหรับอาหารไก่ของแบคทีเรียกรดแลคติกของไทย." วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร ศิลภูมิ . 2546 . "โปรไบโอติกเพื่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ."สัมมนาปริญญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ฐิติพงศ์ ธนะรัชติการนนท์ . 2540 การใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเพื่อเสริมอาหารไก่ . จุฬาวิจัย 6(6) : 10-13.

สุพรรณิการ์ สมใจเพ็ง.2544. "การผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในการหมักไซเลจ." วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิศุภร ลอตระกูล.2542 . "โปรไบโอติกในมนุษย์." สัมมนาปริญญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อำนาจ เจรีรัตน์.2540. "การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลจ."วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Anonymous. 1999 . Use of certain microorganisms as additive feeding stuffs food safety : Form the farm to the fork . Available http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out23_en.htm,April 28 , 1999.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fuller, R. 1989 . Probiotics in man and animal.J.App.Bacteriol.66:365-378

Holt, J.G.,N.R. Krieg,P.H.A.Sneath.,J.T.Stalely and S.T.Wiliams. 1994. Bergey's ManualOf Determinative Bacteriology . 9 th ed., Wiliams and Wilkins.,Maryland.787 p

Lilly,D.M. and R.H. Stillwell.1965 .Probiotic : growth promoting factors produced by Microorganisms.Science.147:747-748

Parker , R.B., G.G. Conchikov and G.B.Lev .1979.Inhibitory activity of lactic acid microflora in Kurunga in relation to coliform bacteria . J. Dairy Sci 41:5976.(Abstract)

"Probiotic" 2001.[Online].Available : http://school.biotec.or.th/html/microbialworld.htm

Parker, R.B. 1974.Probiotic, the other half of the antibiotics story . Amm.Nutr&Health 29 : 4-8

Weinberg,Z.G., and Muck .R.E. 2002. "The survival of silage inoculant lactic acid Bacteria in rumen fluid." [Online]. Available:http://www.dfre.wise.edu/DFRC WebPDFs/2003-Weinberg-GFS-94-1066.pdf

Woolford , M.K. 1985 . The silage fermentation , pp .85-112 . in B.J.B. Wood (ed) Microbiology of Fermented Foods. Elsevier Applied Science Publishers,Essex

Woolford , M.K. 1990. The silage fermentation , pp.137-144 . In T.W. Flegel,G.Thryn and Y.Yuthavong (eds.).Biotechnology for Small Industries.Proceeding of The InternationalSymposium on Application of Biotechnology for Small Industries . Text and Journal Corporation , Bankok.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสภาวะจำลองกระเพาะสัตว์

NaCl	7.305 g/l
KCl	0.522 g/l
$NaHCO_3$	3.781 g/l
Pepsin	3 g/l

การเตรียมสภาวะจำลองลำไส้สัตว์

Pancreatin	0.1%
Bile salt	0.15%

การทำตัวอย่างอาหารให้เจือจางลงตามลำดับ (serial dilution)

การทำตัวอย่างอาหารให้เจือจางลง มักทำให้เจือจางลงระดับละ 10 เท่า (ten fold serial dilution) โดยใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 ในขั้นต้น 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดหรือขวดบรรจุน้ำยาสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าหลอดหรือขวดด้วยเครื่องเขย่าไฟฟ้า (mixer) หรือใช้มือเขย่าขึ้นลงอย่างแรง 25 ครั้ง ตัวอย่างอาหารในขั้นนี้จะมีความเจือจาง 1:100 (10^{-2}) ถ้าต้องการเตรียมตัวอย่างให้เจือจางในระดับต่อไปคือ 1:1000(10^{-3}),1:10000(10^{-4}) เรื่อยไปตามลำดับ ให้กระทำโดยวิธีเดียวกันกับที่กล่าวข้างต้น โดยใช้ตัวอย่างอาหารที่เจือจางในระดับ 1:100 , 1 :1000 เรื่อยไปตามลำดับและควรทำการเปลี่ยนปิเปตใหม่ทุกครั้งในทุกระดับความเจือจางที่ต้องการเตรียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการ spread plate

- เทอาหารเพาะเชื้อ MRS agar + 0.5 % $CaCO_3$ ลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
- ชั่งตัวอย่าง โดยใช้ช้อนสุ่มตักตัวอย่างอาหาร 1 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติก
- ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่ทำการเจือจาง จาก 10 fold dilution จนถึงระดับ 1: 10^8
- ดูดตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 ml. ใส่บน MRS agar 0.5% + $CaCO_3$ plate ที่เทเตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อ
- นำแท่งแก้วรูปตัวแอลที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อจากแอลกอฮอล์ เกลี่ยตัวอย่างที่ใส่ไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ทั่ว
- คว่ำจานแล้วทำการบ่มเพาะเชื้อใน candle jar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน
- ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญในระดับความเจือจางที่เหมาะสม โดยสังเกตโคโลนีที่มีขอบใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี คำนวณหาปริมาณเชื้อต่อกรัมตัวอย่างอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเกศสุดา พอดี เกิดเมื่อวันที่ 13 ตุลาคม ปี พ.ศ.2525 สถานที่เกิดโรงพยาบาลสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรปราการ วุฒิการศึกษา จบการศึกษาชั้นมัธยมตอนปลายที่โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ สวนกุหลาบ วิทยาลัยสมุทรปราการ พ.ศ.2543 และศึกษาต่อในระดับอุดมศึกษา ณ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นายศาสตรา เฉลิมวงศ์วิจิตร เกิดเมื่อวันที่ 22 สิงหาคม พุทธศักราช 2526 สถานที่เกิดโรงพยาบาลหัวเฉียว จังหวัดกรุงเทพมหานคร วุฒิการศึกษา จบการศึกษาชั้นมัธยมตอนปลายที่โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ บดินทรเดชา พ.ศ.2543 และศึกษาต่อในระดับอุดมศึกษา ณ.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้